

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication : 2 762 615
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

①⑫ N° d'enregistrement national : 97 05203

①⑮ Int Cl⁶ : C 12 N 15/86, C 12 N 5/10, A 61 K 48/00 // C 12 N 15/
48

①⑫ DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 28.04.97.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 30.10.98 Bulletin 98/44.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM ET
BLISS PUBLIC A CARACT SCIENT ET TECH — FR.

⑦② Inventeur(s) : LOPEZ LASTRA MARCELO, GABUS
DARLIX CAROLINE et DARLIX JEAN LUC.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ NOUVEAU SITE INTERNE D'ENTREE DES RIBOSOMES ET VECTEUR LE CONTENANT.

⑤⑦ La présente invention concerne l'utilisation d'une sé-
quence nucléotidique dérivée de tout ou partie de l'extrémi-
té 5' de l'ARN génomique d'un rétrovirus de type C à
l'exception des virus de la leucémie murine de Friend
(FMLV) et de Moloney (MoMLV) à titre de site interne d'en-
trée des ribosomes ou d'élément permettant ou améliorant
l'encapsulation de vecteurs rétroviraux Elle a également
pour objet un vecteur comprenant ladite séquence nucléoti-
dique, une particule virale générée à partir de ce vecteur,
une cellule comprenant ce vecteur ou infectée par la parti-
cule virale, leur utilisation thérapeutique ainsi qu'une com-
position pharmaceutique les comprenant.

FR 2 762 615 - A1



- 1 -

La présente invention concerne l'utilisation d'une séquence nucléotidique dérivée de l'extrémité 5' de l'ARN génomique ou de l'ADN proviral d'un virus de la réticuloendothéliose à titre de site interne d'entrée des ribosomes (IRES) et/ou pour améliorer l'encapsidation rétrovirale. Plus particulièrement, elle

5 concerne des vecteurs d'expression comportant cette séquence et notamment des vecteurs polycistroniques permettant l'expression efficace et stable de plusieurs gènes d'intérêt sous la dépendance d'un même promoteur. La présente invention trouve une application intéressante dans le domaine des vecteurs de thérapie génique.

10 La faisabilité de la thérapie génique appliquée à l'homme n'est plus à démontrer et ceci concerne de nombreuses applications thérapeutiques comme les maladies génétiques, les maladies infectieuses et les cancers. De nombreux documents de l'art antérieur décrivent les moyens de mettre en oeuvre une thérapie génique, notamment par l'intermédiaire de vecteurs viraux. D'une

15 manière générale, les vecteurs sont obtenus par délétion d'au moins une partie des gènes viraux qui sont remplacés par les gènes d'intérêt thérapeutique. De tels vecteurs peuvent être propagés dans une lignée de complémentation qui fournit *en trans* les fonctions virales délétées pour générer une particule virale défective pour la réplication mais capable d'infecter une cellule hôte. A ce jour,

20 les vecteurs rétroviraux sont parmi les plus utilisés mais on peut citer également des vecteurs issus des adénovirus, virus associés aux adénovirus, poxvirus et virus de l'herpès. Ce type de vecteur, leur organisation et leur mode d'infection sont largement décrits dans la littérature accessible à l'homme de l'art.

A titre indicatif, le génome rétroviral est constitué par un ARN linéaire,

25 simple brin et de polarité positive. Outre les séquences de régulation R et U5 et U3 et R présentes aux extrémités 5' et 3' respectivement, il porte trois gènes : *gag* codant pour les protéines de la capsid, *pol* codant pour la transcriptase inverse et l'intégrase et *env* codant pour les protéines de l'enveloppe. Les signaux d'encapsidation, situés en aval des séquences U5 jusqu'au début de la

région codante du gène *gag*, participent à la dimérisation et l'encapsidation de l'ARN viral dans les particules virales. L'extrémité 5' du génome comprend une coiffe (cap) et l'extrémité 3' est polyadénylée. Lors du cycle infectieux, l'ARN viral est converti en un ADN proviral linéaire, double brin muni à chaque

5 extrémité de séquences répétées inversées LTRs (pour Long Terminal Repeat en anglais) nécessaires à l'initiation de la transcription. Celle-ci, réalisée par la machinerie cellulaire, permet la production des ARN génomiques et subgénomiques à partir desquels sont synthétisées les protéines virales. Les rétrovirus peuvent être classés en 4 sous-familles A à D, sur la base de leur

10 morphologie. Le type C regroupe la majorité des rétrovirus dont les virus MLV (Murine Leukemia Virus) et MSV (Murine Sarcoma Virus) utilisés dans la plupart des vecteurs de thérapie génique et les virus REV (Reticuloendotheliosis Virus) d'où dérive la séquence nucléotidique de la présente invention.

Il peut être avantageux de disposer de vecteurs de thérapie génique plus

15 performants et capables notamment de produire efficacement plusieurs protéines d'intérêt. Cependant, la présence de plusieurs promoteurs au sein du même vecteur se traduit très souvent par une réduction voire même une perte de l'expression au cours du temps. Ceci est dû à un phénomène bien connu d'interférence entre les séquences promotrices. Dans ce contexte, la publication

20 de la demande internationale WO93/03143 propose une solution à ce problème qui consiste à mettre en oeuvre un site interne d'entrée des ribosomes (IRES). Elle décrit un vecteur rétroviral dicistronique pour l'expression de deux gènes d'intérêt placés sous le contrôle du même promoteur. La présence d'un site IRES de picornavirus entre ceux-ci permet la production du produit

25 d'expression issu du second gène d'intérêt par initiation interne de la traduction de l'ARNm dicistronique.

Normalement, l'entrée des ribosomes au niveau de l'ARN messager (ARNm) se fait par la coiffe située à l'extrémité 5' de l'ensemble des ARNm eucaryotes. Les sous unités ribosomales 40S se déplacent le long de l'ARN

30 jusqu'à rencontrer un codon AUG approprié pour débiter la synthèse protéique.

Généralement, l'initiation a lieu au niveau du premier codon AUG. Mais, si celui-ci est dans un contexte peu favorable, les sous unités 40S poursuivent jusqu'à un codon AUG ultérieur situé dans un meilleur contexte traductionnel (Kozak, 1984, *Nucleic Acid Res.* 12, 3873-3893 ; Kozak, 1991, *J. Biol. Chem.* 266, 19867-19870 ; Pain, 1996, *Eur. J. Biochem.* 236, 747-771).

Cependant, cette règle universelle connaît des exceptions. L'absence de coiffe chez certains ARNm viraux laissait supposer l'existence de structures alternatives permettant l'entrée des ribosomes à un site interne de ces ARN. A ce jour, un certain nombre de ces structures, nommées IRES du fait de leur fonction, ont été identifiées dans la région 5' non codante des ARNm viraux non coiffés comme celle notamment des picornavirus tel que le virus de la poliomyélite (Pelletier et al., 1988, *Mol. Cell. Biol.* 8, 1103-1112) et l'EMCV (Encephalomyocarditis virus (Jang et al., 1988, *J. Virol.* 62, 2636-2643). Des ARNm cellulaires possédant des éléments IRES ont également été décrits. On peut citer ceux codant pour la protéine BIP (pour Immunoglobulin heavy chain binding protein ; Macejak et Sarnow, 1991, *Nature* 353, 90-94), certains facteurs de croissance (Teerink et al., 1995, *Biochem. Biophys. Acts* 1264, 403-408 ; Vagner et al., 1995, *Mol. Cell. Biol.* 15, 35-44), le facteur d'initiation de la traduction eIF4G (Gan et Rhoads, 1996, *J. Biol. Chem.* 271, 623-626) et deux facteurs de transcription de levure TFIID et HAP4 (Iizuka et al., 1994, *Mol. Cell. Biol.*, 14, 7322-7330). Des sites IRES ont également mis en évidence dans les rétrotransposons murins de type VL30 (Berlitz et al., 1995, *J. Virol.* 69, 6400-6407) et, plus récemment dans les ARNm codant pour le précurseur gag des virus de la leucémie murine de Friend (FMLV) et de Moloney (MoMLV) (Berlitz et Darlix, 1995, *J. Virol.* 69, 2214-2222 ; Vagner et al., 1995, *J. Biol. Chem.* 270, 20376-20383).

On a maintenant trouvé un nouveau site interne d'entrée des ribosomes dans la région 5' non codante de l'ARN du virus aviaire de la réticuloendothéliose (REV) de type A (REV-A) et montré son efficacité pour

initier la traduction de séquences codantes placées à sa suite d'une manière monocistronique ou dicistronique.

Le site IRES de la présente invention est particulièrement avantageux par rapport à ceux déjà décrits dans la littérature. En premier lieu, il permet un taux
5 d'expression important du cistron qu'il contrôle. En outre et, de manière inattendue, il peut également, dans le cadre d'un vecteur rétroviral, contribuer ou améliorer, en association avec une région d'encapsidation appropriée, les fonctions de dimérisation ou d'encapsidation, permettant une augmentation du titre viral. Et enfin, du fait de sa faible homologie avec les séquences
10 rétrovirales murines utilisées dans la plupart des vecteurs de thérapie génique destinés à un usage humain, son emploi réduit considérablement le risque de production de virus compétents pour la réplication.

La plupart des protocoles de thérapie génique approuvés par le RAC (Recombinant DNA Advisory Committee) aux Etats Unis utilisent des vecteurs
15 dérivés du virus MoMLV. A l'heure actuelle, le choix d'un vecteur rétroviral spécifique pour une application thérapeutique donnée reste empirique et les facteurs influençant le titre viral et l'expression des gènes n'ont pas encore été clairement élucidés. L'étude des séquences agissant *en cis* qui contrôlent l'encapsidation et l'établissement des forces relatives de divers éléments IRES
20 peuvent permettre d'optimiser les vecteurs de thérapie génique en termes de titre et d'expression génique. Un des buts de la présente invention est de proposer de nouveaux vecteurs rétroviraux susceptibles d'être propagés à haut titre et de permettre une expression optimale d'un ou plusieurs gènes d'intérêt.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet l'utilisation d'une
25 séquence nucléotidique dérivée de tout ou partie de l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un rétrovirus de type C à l'exception des virus de la leucémie murine de Friend (FMLV) et de Moloney (MoMLV), à titre de site interne d'entrée des ribosomes (IRES) dans un vecteur et/ou pour permettre ou améliorer l'encapsidation d'un vecteur rétroviral.

30 Par séquence nucléotidique, on entend une séquence composée de ribo

(ARN) ou de désoxyribonucléotides (ADN). Dans le cadre de la présente invention, l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un rétrovirus correspond au quart 5' dudit ARN qui s'étend du site d'initiation de la transcription (nucléotide + 1) jusqu'à environ 2 kb dans la direction 3'. Le terme *rétrovirus* est largement défini dans les ouvrages de base de virologie accessibles à l'homme de l'art et les caractéristiques essentielles ont été résumées à titre indicatif ci-dessus. Le terme "dérivée" fait référence à une séquence ayant une origine rétrovirale de type C, mais qui peut avoir subi au moins une modification par rapport à la séquence native. La ou les modifications envisageables incluent la délétion, l'addition, la substitution et/ou la mutation d'un ou plusieurs nucléotides (nt). De telles modifications peuvent avoir pour but par exemple d'accroître les fonctions IRES, d'encapsidation ou d'introduire des sites de restriction adéquates pour faciliter les étapes de clonage ultérieures. Le terme "dérivée" comprend également l'équivalent ADN de l'ARN génomique sous une forme modifiée ou non.

Par IRES, on désigne un site capable de promouvoir l'entrée des ribosomes dans une molécule d'ARN d'une manière indépendante de la coiffe. Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, la fonction IRES peut s'exercer dans tout vecteur ou cassette d'expression. Une séquence en usage dans le cadre de la présente invention peut également agir en tant qu'élément activateur de l'encapsidation des rétrovirus ou vecteurs rétroviraux en favorisant la dimérisation de deux copies du génome rétroviral et/ou l'encapsidation du dimère dans les particules virales. Selon un mode de réalisation préféré, ladite séquence est capable d'exercer une fonction IRES et d'améliorer la fonction d'encapsidation lorsqu'elle est introduite dans un vecteur rétroviral approprié.

Une séquence nucléotidique telle qu'utilisée dans le cadre de la présente invention, peut être isolée de l'extrémité 5' de l'ARN génomique ou de l'ADN proviral d'un rétrovirus de type C ou de tout plasmide de l'état de la technique portant le fragment rétroviral d'intérêt. Il va sans dire qu'elle peut être générée

par toute technique en usage dans le domaine de l'art, par exemple par clonage à l'aide de sondes appropriées, par PCR (Polymerase Chain reaction) ou encore par synthèse chimique. Avantageusement, ladite séquence comprend tout ou partie de la région qui suit le domaine U3 du LTR 5', jusqu'au codon AUG
5 initiateur du gène *gag*. Aux fins de la présente invention, elle comprend au moins 50 nucléotides, avantageusement au moins 100 nucléotides, de préférence au moins 200 nucléotides et de manière préférée au moins 300 nucléotides compris dans ladite extrémité 5'. Mais, bien entendu, elle peut s'étendre au delà dans la direction 5' ou 3' ou comporter des séquences supplémentaires.

10 On préfère mettre en oeuvre dans le cadre de la présente invention un rétrovirus de type C à l'exception des virus FMLV et MoMLV. Un rétrovirus de type C convenant plus particulièrement, est sélectionné parmi les virus REV (Virus de la réticuloendothéliose), MSV (Murine sarcoma virus) et notamment celui de Moloney (MMSV), MHV (*Mus hortulanus* virus), MEV (Mouse
15 endogenous retrovirus), FMOV (FBR murine osteosarcoma virus), AMLV (AKV murine leukemia virus), MEELV (Mouse endogenous ecotropic murine leukemia virus), SFFV (Friend spleen focus-forming virus), RASV (rat sarcoma virus), FLV (Feline leukemia virus), FSV (feline sarcoma virus), EFLV (Cat endogenous proviral feline leukemia virus), SSV (Simian sarcoma virus),
20 GALV (Gibbon ape leukemia virus) et BAEV (Baboon endogenous virus).

Selon un mode de réalisation tout à fait préféré, une séquence nucléotidique en usage dans la présente invention dérive de tout ou partie de l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un virus de la réticuloendothéliose (REV). Les virus REV comprennent notamment différents sous-types A, B et T ainsi
25 que les virus DIAV (Duck infectious anemia virus), SNV (spleen necrosis virus) et CSV (Chick syncytial virus) (voir par exemple Encyclopedia of Virology, 1994, Enrietto, Reticuloendotheliosis viruses, p1227-1232 Ed. R. Webster et A. Granoff, Academic Press, Hartourt Brace & Company Publishers). Un virus REV convenant tout particulièrement est le virus de la réticuloendothéliose
30 aviaire, notamment celui de type A (REV-A).

Selon cette dernière variante, on aura de préférence recours à une séquence nucléotidique comprenant au moins 100 nucléotides et au plus 800 nucléotides (nt) de l'extrémité 5' non codante du virus REV-A et plus particulièrement une séquence nucléotidique substantiellement homologue ou identique à tout ou partie de la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 1. A titre d'exemples préférés, on peut citer une séquence nucléotidique substantiellement homologue ou identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 :

- (i) commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 578,
- 10 (ii) commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578,
ou
- (iii) commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578.

Le terme substantiellement homologue fait référence à un degré d'homologie supérieur à 70%, avantageusement supérieur à 80%, de préférence supérieur à 90% et, de manière tout à fait préférée, supérieur à 95%. Comme déjà indiqué, ladite séquence nucléotidique peut avoir une séquence légèrement différente de celle décrite dans la SEQ ID NO: 1 ou 2, à la condition toutefois que la ou les modifications n'affecte(nt) pas ses fonctions IRES et/ou d'encapsidation.

20 Selon un mode avantageux, la séquence nucléotidique utilisée dans le cadre de la présente invention est identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 :

- (i) commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 578,
- (ii) commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578,
- 25 ou
- (iii) commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578.

La fonction IRES de ladite séquence nucléotidique est particulièrement avantageuse dans un contexte pauvre en ion magnésium, par exemple dans un contexte cellulaire. Une concentration élevée en ions Mg^{2+} peut diminuer l'efficacité de l'initiation de la traduction médiée par la séquence.

30

Une séquence nucléotidique en usage dans la présente invention, est plus particulièrement destinée à être intégrée dans un vecteur de transfert et d'expression d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt. Le choix d'un tel vecteur est large et les techniques de clonage dans le vecteur retenu sont à la portée de l'homme de l'art. Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, on peut envisager un vecteur plasmidique ou un vecteur dérivé d'un virus animal et, en particulier, d'un poxvirus (canari pox ou virus de la vaccine), adénovirus, baculovirus, virus de l'herpès, virus associé à un adénovirus ou rétrovirus. De tels vecteurs sont largement décrits dans la littérature. En particulier, lorsqu'il s'agit d'un vecteur adénoviral, celui-ci peut être issu d'un adénovirus humain (de préférence de type 2 ou 5), animal (de préférence canin ou bovin) ou encore d'un hybride entre des espèces variées. La technologie générale concernant les adénovirus est divulguée dans Graham et Prevec (1991, Methods in Molecular Biology, Vol 7, Gene transfer and Expression Protocols ; Ed E.J. Murray, the Human Press Inc, p 109-118).

Conformément aux buts poursuivis dans le cadre de la présente invention, ladite séquence nucléotidique est de préférence positionnée en amont d'un gène d'intérêt pour améliorer la traduction du produit d'expression pour lequel celui-ci code. Elle peut être mise en oeuvre dans une cassette d'expression de type monocistronique (pour l'expression d'un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur) ou polycistronique (pour l'expression d'au moins deux gènes d'intérêt placés sous le contrôle d'un même promoteur). Cette dernière peut contenir plusieurs éléments en tandem "site IRES-gène d'intérêt" dont au moins un des sites IRES est constitué par une séquence nucléotidique telle que définie auparavant. On préfère tout particulièrement l'utilisation dans une cassette dicistronique soit en amont du premier gène d'intérêt soit en amont du second, cette dernière variante étant la préférée.

Lorsqu'un vecteur selon l'invention comprend plusieurs cassettes d'expression, celles-ci peuvent être insérées dans une orientation quelconque les unes par rapport aux autres, soit dans une même orientation (promoteur agissant

dans une même direction) ou en orientation réverse (promoteur agissant dans une orientation opposée). Par ailleurs, un vecteur selon l'invention peut comprendre plusieurs séquences nucléotidiques en usage selon l'invention. Dans ce cas, il est préférable qu'elles dérivent de rétrovirus de type C différents.

5 Selon un mode de réalisation tout à fait préféré, un vecteur selon l'invention dérive d'un rétrovirus. On peut citer à titre d'exemples, les rétrovirus aviaires tels que le virus de l'érythroblastose aviaire (AEV), le virus de la leucémie aviaire (AVL), le virus du sarcome aviaire (ASV), le virus de la nécrose de la rate (SNV) et le virus du sarcome de Rous (RSV), les rétrovirus
10 bovins, les rétrovirus félins (FLV, FSV....), les rétrovirus murins tels que le virus de la leucémie murine (MuLV), le virus de Friend (FMLV) et le virus du sarcome murin (MSV) et les rétrovirus de primate (GALV, FSV, BAEV...). Bien entendu, d'autres rétrovirus peuvent être mis en oeuvre. Cependant, on préfère tout particulièrement avoir recours au virus MoMLV. Les nombreux
15 vecteurs rétroviraux décrits dans la littérature peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention.

 Les vecteurs rétroviraux envisageables aux fins de la présente invention comprennent au moins les éléments suivants associés d'une manière fonctionnelle : un LTR 5' et un LTR 3' rétroviraux, un ou plusieurs gène(s)
20 d'intérêt, et la séquence nucléotidique en usage dans le cadre de la présente invention pour permettre ou améliorer l'encapsidation dudit vecteur dans une particule virale et/ou à titre de site IRES pour permettre ou favoriser l'expression d'un gène d'intérêt positionné en aval de ladite séquence nucléotidique. Il va sans dire que le LTR 5' rétroviral peut être utilisé comme
25 promoteur mais on peut également avoir recours à un promoteur interne. Par ailleurs, le LTR 5' et éventuellement 3' peuvent avoir la même origine rétrovirale (par exemple REV) que la séquence nucléotidique ou une origine différente. Par exemple, un vecteur monocistronique comprendra de 5' vers 3' un LTR 5', la séquence nucléotidique, un gène d'intérêt et un LTR 3'.

30 Bien entendu, un vecteur rétroviral selon l'invention peut également

comprendre une région d'encapsidation (E+) conventionnelle. Cependant, la présence de cette dernière n'est pas exigée lorsque la séquence nucléotidique en usage dans la présente invention peut exercer à elle-seule la fonction d'encapsidation. Un tel mode de réalisation peut être plus particulièrement envisagé lorsque le LTR 5' rétroviral dérive d'un virus REV et, de préférence du SNV, et la séquence nucléotidique est substantiellement homologue ou identique à la séquence présentée dans la SEQ ID NO: 2, commençant au nt 1 et se terminant au nt 578 ou commençant au nt 265 et se terminant au nt 578.

Selon un mode de réalisation avantageux, un vecteur rétroviral selon l'invention, comprend au moins :

- (a) un LTR 5' rétroviral,
- (b) une région d'encapsidation,
- (c) de manière optionnelle, un premier gène d'intérêt suivi d'une région promotrice interne d'une origine différente de celle dudit LTR 5' rétroviral,
- (d) un second gène d'intérêt,
- (e) un site IRES,
- (f) un troisième gène d'intérêt, et
- (g) un LTR 3' rétroviral,

l'un au moins de la région d'encapsidation et du site IRES étant constitué par ladite séquence nucléotidique en usage selon l'invention.

Dans le cas où le vecteur rétroviral selon l'invention comporte une cassette d'expression dirigée par une région promotrice interne, il est préférable pour favoriser l'expression génique, que celle-ci soit dans une orientation inverse par rapport aux LTRs 5' et 3' rétroviraux. On peut également inclure d'autres éléments, par exemple un autre site IRES et un autre gène d'intérêt ou une autre cassette d'expression.

Un vecteur rétroviral préféré selon l'invention comprend une région d'encapsidation dérivant d'un rétrovirus murin, notamment d'un MoMLV, ou d'un rétrotransposon de type VL30 et un site IRES comprenant une séquence

nucléotidique substantiellement homologue ou identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 :

- (i) commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 578,
- (ii) commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578,
- 5 ou
- (iii) commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578.

On peut citer en particulier les vecteurs rétroviraux dicistroniques de type pREV HW-3 et HW-6, dans lesquels la région d'encapsidation dérive d'un MoMLV et le site IRES est constitué par une séquence nucléotidique identique
10 à la séquence présentée dans la SEQ ID NO: 2 commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578 ou commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578. Bien entendu, l'homme du métier peut faire varier les gènes d'intérêt selon l'effet thérapeutique recherché.

Aux fins de la présente invention, un gène d'intérêt en usage dans
15 l'invention peut être obtenu d'un organisme eucaryote, procaryote ou d'un virus par toute technique conventionnelle de biologie moléculaire. Il peut coder pour un polypeptide correspondant à une protéine native telle que trouvée dans la nature homologue à la cellule hôte ou non, un fragment protéique, une protéine chimérique provenant de la fusion de polypeptides d'origines diverses ou un
20 mutant présentant des propriétés biologiques améliorées et/ou modifiées. Un tel mutant peut être généré par substitution, délétion et/ou addition d'un ou plusieurs résidus acides aminés. En outre, le polypeptide peut être (i) intracellulaire (ii) membranaire présent à la surface de la cellule hôte ou encore (iii) sécrété hors de la cellule hôte et donc comprendre des éléments additionnels
25 appropriés, comme une séquence codant pour un signal de sécrétion ou une région d'ancrage transmembranaire.

On préfère tout particulièrement mettre en oeuvre un gène d'intérêt thérapeutique codant pour un produit d'expression capable d'inhiber ou retarder l'établissement et/ou le développement d'une maladie génétique ou acquise. Un
30 vecteur selon l'invention est particulièrement destiné à la prévention ou au

traitement de la mucoviscidose, de l'hémophilie A ou B, de la myopathie de Duchenne ou de Becker, du cancer, du SIDA et d'autres maladies infectieuses dues à un organisme pathogène : virus, bactérie, parasite ou prion. Les gènes d'intérêt utilisables dans la présente invention, sont ceux qui codent pour les

5 protéines suivantes :

- une cytokine et notamment une interleukine (IL), en particulier l'IL-2, un interféron, notamment interféron alpha, bêta, gamma, un facteur de nécrose tissulaire et un facteur de croissance et notamment hématopoïétique (G-CSF, GM-CSF),
- 10 - un facteur ou cofacteur impliqué dans la coagulation et notamment le facteur VIII, le facteur IX, le facteur von Willebrand, l'antithrombine III, la protéine C, la thrombine et l'hirudine,
- une enzyme et notamment la trypsine, une ribonucléase, la phosphatase alcaline (plap) et la β -galactosidase,
- 15 - un inhibiteur d'enzyme tel que l' α 1-antitrypsine et les inhibiteurs de protéases virales
- un produit d'expression d'un gène suicide comme la thymidine kinase du virus HSV (virus de l'herpès) de type 1,
- un activateur ou un inhibiteur de canaux ioniques,
- 20 - une protéine dont l'absence, la modification ou la dérégulation de l'expression est responsable d'une maladie génétique, telle que la protéine CFTR, la dystrophine ou minidystrophine, l'insuline, l'ADA (adénosine diaminase), la glucocérébrosidase et la phénylhydroxylase,
- une protéine capable d'inhiber l'initiation ou la progression de cancers,
- 25 telles que les produits d'expression des gènes supresseurs de tumeurs, par exemple les gènes p53 et Rb, et
- une protéine capable de stimuler une réponse immunitaire, un anticorps, les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité ou une immunotoxine,
- 30 - une protéine capable d'inhiber une infection virale ou son

développement, par exemple les épitopes antigéniques du virus en cause ou des variants altérés de protéines virales susceptibles d'entrer en compétition avec les protéines virales natives.

Par ailleurs, un gène d'intérêt en usage dans la présente invention, peut également coder pour un marqueur de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules hôtes transfectées par un vecteur selon l'invention. On peut citer le gène *neo* (néomycine) conférant une résistance à l'antibiotique G418, le gène *dhfr* (dihydrofolate réductase), le gène CAT (Chloramphenicol Acetyl Transférase) ou encore le gène *gpt* (xanthine phosphoribosyl).

D'une manière générale, on aura recours pour l'expression d'un ou des gène(s) d'intérêt à un promoteur fonctionnel dans la cellule hôte considérée et, de préférence, une cellule humaine. Le choix du promoteur est très large et à la portée de l'homme du métier. Il peut s'agir d'un promoteur gouvernant naturellement l'expression d'un gène d'intérêt en usage dans la présente invention ou de tout autre promoteur d'une origine quelconque. Par ailleurs, il peut être de nature constitutive ou régulable, notamment en réponse à certains signaux cellulaires tissu-spécifiques ou événements-spécifiques. Par exemple, il peut être avantageux de cibler l'expression du gène d'intérêt au niveau des cellules lymphocytaires dans le cadre du SIDA, des cellules pulmonaires dans le cadre de la mucoviscidose ou des cellules musculaires dans le cadre des myopathies.

A titre d'exemples, les promoteurs convenant dans le cadre de la présente invention peuvent être choisis parmi les promoteurs SV40 (Virus Simian 40), CMV (Cytomégalovirus), HMG (Hydroxyméthyl-Glutaryl Coenzyme A), TK (Thymidine kinase), les LTRs rétroviraux comme celui du MoMLV, RSV ou du MSV lorsqu'on met en oeuvre un vecteur rétroviral, le promoteur adénoviral tardif MLP (Major Late Promoteur) notamment dans le contexte d'un vecteur adénoviral, les promoteurs 7,5K et HSR destinés à des vecteurs poxviraux comme le virus de la vaccine, le promoteur PGK (Phosphoglycero kinase), les promoteurs foie-spécifiques des gènes codant pour

l' α 1-antitrypsine, le facteur IX, l'albumine et la transferrine, les promoteurs des gènes d'immunoglobulines qui permettent une expression dans les lymphocytes, et enfin les promoteurs des gènes codant pour le surfactant ou la protéine CFTR qui présentent une certaine spécificité pour les tissus pulmonaires.

5 Par ailleurs, le gène d'intérêt en usage dans la présente invention peut comporter d'autres séquences améliorant son expression, tant au niveau de la transcription que de la traduction ; par exemple une séquence activatrice de la transcription de type enhancer, une séquence intronique, un signal de terminaison de la transcription (polyA) et, comme indiqué précédemment, un
10 signal de sécrétion ou une région transmembranaire.

L'invention couvre également les particules virales générées à partir d'un vecteur viral selon l'invention. On procède généralement par transfection de celui-ci dans une lignée cellulaire adéquate. Si le vecteur viral utilisé est défectif pour la réplication, on aura recours à une lignée de complémentation.
15 D'une manière générale, l'homme du métier connaît les lignées pouvant être employées pour générer des particules virales infectieuses ainsi que le procédé à mettre en oeuvre selon le vecteur utilisé.

Par exemple, dans le cas d'un vecteur adénoviral, on peut avoir recours à la lignée 293 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol., 36, 59-72). S'agissant
20 d'un vecteur rétroviral, on peut envisager d'employer des lignées cellulaires écotropes, comme la lignée CRE (Danos et Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6460-6464) ou GP+E-86 (Markowitz et al., 1988, J. Virol., 62, 1120-1124). Mais on préfère tout particulièrement mettre en oeuvre une lignée de complémentation amphotrope telle que la lignée PG13 (Miller et al., 1991,
25 J. Virol., 65, 2220-2224) ou Psi Env-am (Markowitz et al., 1988, T.A.A.P. Vol. CI, 212-218). Généralement, on récupère les particules virales infectieuses dans le surnageant de culture des cellules de complémentation transfectées.

L'invention s'étend également aux cellules comprenant un vecteur selon l'invention ou infectées par des particules virales infectieuses selon l'invention.
30 Les méthodes de transfection sont bien connues de l'homme de l'art. On peut

citer la technique de précipitation au phosphate de calcium, celle au DEAE dextrane, la microinjection ou l'encapsulation dans des véhicules lipidiques. D'autre part, les vecteurs selon l'invention peuvent être présents dans la cellule hôte sous forme intégrée dans le génome cellulaire ou sous forme d'épisomes
5 aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme. La cellule selon l'invention est avantageusement une cellule eucaryote, notamment mammifère et, de préférence, une cellule humaine. Il peut s'agir d'une cellule primaire ou tumorale d'une origine hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte, macrophage ...), hépatique, épithéliale, fibroblaste, du
10 système nerveux central et, tout particulièrement, d'une cellule musculaire (myoblaste, myocyte, cellule satellite...) trachéale ou pulmonaire.

La présente invention concerne également l'usage thérapeutique d'un vecteur, d'une particule virale ou d'une cellule selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la
15 prévention d'une maladie génétique, d'une maladie acquise comme le cancer ou d'une maladie infectieuse.

Cependant, un tel usage n'est pas limité à une application de type thérapie génique somatique. En particulier, un vecteur selon l'invention peut être utilisé à d'autres fins comme la production par voie recombinante dans des
20 cellules procaryotes ou eucaryotes de produit(s) d'expression codé(s) par au moins un des gènes d'intérêt. Par exemple, on peut envisager la coexpression de deux gènes d'intérêt dans un vecteur d'expression dicistronique utilisant une séquence nucléotidique selon l'invention. La coexpression d'un gène de résistance à un antibiotique à titre de second cistron peut permettre d'augmenter
25 l'expression d'un premier cistron. Il est possible d'obtenir un produit mature par la coexpression de deux gènes dont le produit d'expression de l'un permet la maturation du polypeptide codé par l'autre (par exemple précurseur polypeptidique et une protéase clivant le précurseur en polypeptide mature). Dans ce cas, on peut avoir recours à des cellules procaryotes (E.coli ...),
30 eucaryotes inférieures (levure, champignon, insecte ...) ou animales. Il s'agira

ensuite de récolter et éventuellement purifier ledit produit d'expression d'intérêt du surnageant ou de la culture cellulaire par les techniques conventionnelles. Une autre possibilité d'utilisation consiste en la production d'animaux transgéniques ayant intégré dans leur génome une cassette pour l'expression d'un ou plusieurs gènes d'intérêt et comprenant une séquence nucléotidique selon l'invention. Il peut s'agir de souris, rats, lapins, poissons, primates ou d'animaux de ferme (bovins, ovins, porcins ...) Les techniques pour générer ces animaux transgéniques sont connues. Le polypeptide d'intérêt peut être récupéré de manière conventionnelle par exemple dans les fluides biologiques (sang, lait ... etc) de l'animal.

L'invention s'adresse également à une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un vecteur, une particule virale ou une cellule selon l'invention, en association avec un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement efficace d'un tel agent à un support, un diluant ou un adjuvant acceptable. Elle peut être administrée selon n'importe quelle route d'administration et ceci en dose unique ou répétée après un certain délai d'intervalle. On préférera notamment l'administration intraveineuse, intramusculaire, intrapulmonaire (éventuellement par aérosolisation) ou intratumorale. La quantité à administrer sera choisie en fonction de différents critères, en particulier l'usage à titre de traitement ou de vaccin, la voie d'administration, le patient, le type de maladie à traiter et son état d'évolution, la durée du traitement, le vecteur retenu ...etc. A titre indicatif, une composition pharmaceutique selon l'invention comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu (unité formant des plages), avantageusement entre 10^5 et 10^{13} pfu et, de préférence, entre 10^6 et 10^{11} pfu de particules virales.

Par ailleurs, l'invention concerne une méthode de traitement de maladies génétiques, cancers et maladies infectieuses selon laquelle on administre une

quantité thérapeutiquement efficace d'un vecteur, d'une particule virale ou d'une cellule selon l'invention à un patient ayant besoin d'un tel traitement. Selon un premier protocole thérapeutique, on peut les administrer directement *in vivo*, par exemple par injection intraveineuse, intramusculaire ou par aérosolisation dans les poumons. De manière alternative, on peut adopter un protocole de

5 thérapie génique *ex vivo* qui consiste à prélever les cellules d'un patient, cellules souches de la moelle osseuse ou lymphocytes du sang périphérique, à les transfecter avec un vecteur selon l'invention et à les cultiver *in vitro* avant de les réimplanter au patient.

10 L'invention est illustrée ci-après par référence aux figures suivantes.

La Figure 1 est une représentation schématique des plasmides monocistroniques utilisés comme matrices pour la synthèse *in vitro* d'ARN coiffés et non-coiffés. Ils contiennent le promoteur précoce du cytomégalo virus (Po CMV) utilisable pour l'expression *in vivo*, le promoteur du gène codant pour l'ARN polymérase du phage T7 (Po T7) utilisable pour les expériences *in*

15 *vitro*, différentes portions de l'extrémité 5' non traduite (leader) du virus REV-A (1 à 578 pour pREV CB-95, 578 à 1 pour pREV CG-53, 1 à 578 délétées des nt 268 à 452 pour pREV CG-54, 265 à 578 pour pREV CG-55 et 452 à 578 pour pREV CG-56) et le gène LacZ (Δ LacZ) codant pour une β -galactosidase

20 tronquée à l'extrémité C-terminale de masse moléculaire d'environ 46 kDa.

La Figure 2 est une représentation schématique des plasmides dicistroniques utilisés comme matrices pour la synthèse *in vitro* d'ARN coiffés et non-coiffés. Ils contiennent le promoteur précoce du cytomégalo virus (Po CMV) utilisable pour l'expression *in vivo*, le promoteur du gène codant pour

25 l'ARN polymérase du phage T7 (Po T7) utilisable pour les expériences *in vitro*, le gène neo, différentes portions de l'extrémité 5' non traduite (leader) du virus REV-A (1 à 578 pour pREV CB-54, 578 à 1 pour pREV CG-50, 1 à 578 délétées des nt 268 à 452 pour pREV CG-52, 265 à 578 pour pREV CB-55 et 452 à 578 pour pREV CG-58) et le gène LacZ (Δ LacZ) codant pour une β -

galactosidase tronquée à l'extrémité C-terminale de masse moléculaire d'environ 46 kDa.

La Figure 3 A est une représentation schématique des vecteurs rétroviraux dicistroniques possédant deux éléments d'origine rétrovirale différente, à titre d'IRES et de région d'encapsidation (E) et deux gènes d'intérêt comme les gènes rapporteurs *plap* codant pour la phosphatase alcaline placentaire et *neo* codant pour la neomycine phosphotransférase. B) Vecteurs rétroviraux de la série pREV HW possédant des LTRs dérivés de MLV et placés dans un contexte plasmidique pBR322. VL30E+ correspond à la région 5' non traduite de HaMSV et MoMLV E+ correspond à la région d'encapsidation de MoMLV. C) Vecteur de référence pEMCV-CBTv ayant des LTR et la région d'encapsidation de MoMLV et l'IRES de EMCV. Dans tous les cas, les séquences sont numérotées par rapport au site cap (position +1) de l'ARN génomique.

La Figure 4 illustre l'effet de la rapamycine sur les activités A) phosphatase alcaline et B) neomycine phosphotransférase produites dans les cellules GP+E-86 non transfectées ou transfectées de manière stables par les différents vecteurs pREV HW ou pEMCV-CBTv (pCB100) et traitées par la rapamycine (boîtes pleines) ou non traitées (contrôle, boîtes pointillées).

EXEMPLES

Les constructions ci-après décrites sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire détaillées dans Sambrook et al. (1989, Molecular cloning : A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Les techniques de PCR sont connues de l'homme de l'art et abondamment décrites dans PCR Protocols, a guide to methods and applications (Ed : Innis, Gelfand, Sninsky et White, Academic Press, Inc.). Les amplifications d'ADN

plasmidique sont réalisées dans *Escherichia coli* HB101 souche 1035 (*recA*). Par ailleurs, la position des séquences REV-A utilisées dans les constructions est indiquée par référence à la molécule ARN, la position +1 correspondant au premier nucléotide de la molécule d'ARN, c'est à dire au site d'initiation de la transcription (Darlix et al., 1992, J. Virol. 66: 7245-7252).

EXEMPLE 1 : Identification d'un site IRES au niveau de l'extrémité 5'
 leader de l'ARN de REV-A.

Des études de synthèse protéique *in vitro* ont été entreprises à l'aide d'une série de plasmides mono et dicistroniques contenant des fragments du leader 5' de l'ARN génomique REV-A afin de rechercher s'ils permettent la traduction de cistrons par liaison interne des ribosomes.

1. Construction des plasmides mono et dicistroniques.

Les fragments d'ADN correspondant aux séquences 1 à 578, 265 à 578 et 452 à 578 de l'ARN REV-A sont isolés par PCR à partir de la matrice pREVSC-1 (Darlix et al., 1992, J. Virol. 66, 7245-7252). On utilise des amorces appropriées que l'homme du métier peut concevoir, munies à leurs extrémités d'un site *NheI*. Après digestion par cette enzyme, les fragments PCR sont insérés en amont du gène LacZ dans le vecteur pEMCV-M260-837 (Berlioz et al., 1995, J. Virol. 69, 6400-6407) préalablement clivé par *NheI*. Le gène LacZ mis en oeuvre code pour un produit β -galactosidase tronqué à l'extrémité C-terminale. On obtient les plasmides monocistroniques pREV CB-95 (1-578), pREV CG-55 (265-578) et pREV CG-56 (452-578) illustrés à la Figure 1. Les plasmides dicistroniques pREV CB-54 (1-578), pREV CB-55 (265-578) et pREV CG-58 (452-578) sont représentés à la Figure 2 et résultent de l'insertion des fragments PCR précédents entre les gènes *neo* et LacZ de pEMCV-D260-837 (pCB101) (Berlioz et al., 1995, J. Virol. 69, 6400-6407) également soumis

à une digestion par *NheI*. L'amplification des nt 1 à 578 délétes des séquences 268 à 452 est réalisée à partir du vecteur pREVSC-1 préalablement digéré par *KpnI* et *SacI*, traité par le fragment Klenow de l'ADN polymérase d'*E. coli* et reliqué. Le fragment amplifié digéré par *NheI* est cloné dans pEMCV-M260-837
5 en amont du gène LacZ ou entre les gènes *neo* et LacZ de pEMCV-D260-837, les deux vecteurs ayant été digérés par *NheI*, pour donner respectivement pREV CG-54 (Fig 1) et pREV CG-52 (Fig 2). Enfin des plasmides contrôles monocistronique pREV CG-53 (Fig 1) et dicistronique pREV CG-50 (Fig 2) ont été construits par introduction du fragment PCR portant les séquences REV-A
10 1 à 578 dans les vecteurs précédents en orientation inverse (578-1). Dans l'ensemble des constructions contenant les séquences REV-A en orientation sens, l'initiation de la traduction de la β -galactosidase est sous le contrôle du codon AUG du gène gag de REV-A situé en position 574-576, alors que dans les plasmides contrôles, la synthèse de la β -galactosidase dépend d'un AUG
15 placé dans un contexte de Kozak favorable introduit par PCR.

2. Synthèse d'ARN et traduction *in vitro*.

Les ARN coiffés et non coiffés sont synthétisés à partir de 1 μ g d'ADN plasmidique linéarisé par *SspI* (position 1240 dans le gène LacZ) à l'aide de
20 l'ARN polymérase T7 (mMessage mMachine™ ou MAXIscript™, Ambion) dans un volume réactionnel de 20 μ l selon le protocole indiqué par le fournisseur. La transcription est stoppée par traitement de la matrice ADN par l'enzyme DNaseI suivi d'une précipitation des ARN en présence de chlorure de lithium. Les ARN sont repris dans 50 μ l de tampon TE (Tris-HCl 10 mM
25 pH7,5, EDTA 1mM) avant d'être purifiés et désalés par passage sur une colonne S-300 MicroSpin™ (Pharmacia BioTech) selon les indications du fournisseur. L'intégrité des ARN transcrits est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % contenant du bromure d'éthidium (0,5 μ g/ml). La concentration finale en ARN est déterminée spectrophotométriquement.

Les ARN coiffés et non coiffés (10 µg/ml) sont traduits dans le système cellulaire RRL (Promega) utilisé à 50 % de sa concentration initiale en présence de 1 mCi de [³⁵S] méthionine par ml (Amersham) à 31°C pendant 1 h. Le mélange réactionnel est supplémenté par de l'acétate de potassium à une concentration finale de 120 mM. Par ailleurs, l'ARN luciférase est testé dans les mêmes conditions réactionnelles (témoin positif). Un essai mené en absence d'ARN constitue le témoin négatif. En parallèle, on teste l'effet de la protéase L du virus FMDV (Foot and mouth disease virus) sur la traduction des ARN dicistroniques. Cette protéase clive le facteur d'initiation de la traduction eIF4G entre la glycine en position 479 et l'arginine en position 480 pour générer deux fragments peptidiques dépourvus d'activité initiatrice (Kirchweiger et al., 1995, J. Virol. 68, 5677-5684). En outre, Ohlmann et al. (1995, Nucleic Acid Res. 23, 334-340 ; 1996, EMBO J. 15, 1371-1382) a montré que le traitement des lysats de réticulocyte par la protéase L inhibe la traduction *in vitro* des ARN cellulaires coiffés alors que l'initiation interne dirigée par l'IRES du cardiovirus n'est pas touchée. Ainsi si un élément IRES existe dans le leader 5' REV-A, la présence de la protéase L ne devrait pas affecter l'expression du cistron dont la traduction est sous sa dépendance. Dans ce cas, les essais mettent en oeuvre le système RRL Flexi (Promega) à 50 % de sa concentration initiale, 8 µg/ml d'ARN, 1 mCi de [³⁵S] méthionine par ml (Amersham) et 30 ng de protéase L recombinante et purifiée par les méthodes conventionnelles. Le mélange réactionnel est supplémenté par du chlorure de potassium à une concentration finale de 80 mM. La réaction est poursuivie à 31°C pendant 1 h.

Les échantillons sont dénaturés par la chaleur dans 62,5 mM de Tris-HCl pH6,8, 2 % de sodium dodecyl sulphate (SDS), 10 % de glycérol, 5 % de β-mercaptoéthanol et 0,02 % de bleu de bromophénol et les protéines marquées analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % (poids/vol), 0,2 % SDS. Le produit du gène neo et la β-galactosidase migrent à une masse moléculaire d'environ 28 et 46 kDa respectivement. L'efficacité de la traduction coiffe-dépendante et indépendante est quantifiée par scanographie (Phospho-

Imageur Storm 840, version 4.00, Molecular Dynamics ; Image Quant TM version 1.1, Molecular Dynamics). Dans le cas des vecteurs dicistroniques, l'intensité du marquage du produit d'expression du second cistron (β -galactosidase) dont la traduction est médiée par l'IRES est évaluée après
5 standardisation du niveau d'expression du produit neo.

On observe que la traduction des ARN non coiffés obtenus à partir des plasmides monocistroniques pREV CB-95, pREV CG-53, pREV CG-54, pREV CG-55 et pREV CG-56 est aussi efficace que celle des ARN coiffés. Cependant, comme attendu, la quantité de β -galactosidase générée à partir du plasmide
10 pREV CG-53 dans lequel les séquences REV-A (1 à 578) sont en orientation antisens est beaucoup plus faible que celle obtenue avec les constructions utilisant une séquence REV-A dans l'orientation sens. Lorsque les fragments REV-A sont mis en oeuvre d'une manière dicistronique entre les gènes neo et LacZ, l'expression de la β -galactosidase n'apparaît qu'en présence d'un IRES
15 fonctionnel (pREV CB-54, pREV CB-55, et pREV CG-52) alors que celle du premier cistron (neo) est efficace dans tous les cas (y compris pREV CG-50). Des essais comparatifs de traduction *in vitro* menés avec les vecteurs précédents et le plasmide pEMCV-D260-837 comprenant l'IRES EMCV de référence montrent que les fragments REV-A 1-578, 265-578 et 452-578 sont capables
20 d'initier la traduction du second cistron d'une manière plus efficace que celle dirigée par l'IRES EMCV. Par ailleurs, le traitement des lysats de réticulocytes par la protéase L s'accompagne d'une inhibition de l'expression coiffe-dépendante du gène neo alors que l'expression de la β -galactosidase dépendante de l'IRES est sensiblement augmentée. Pour le témoin pREV CG-50, on
25 observe également l'inhibition de l'expression neo alors que l'expression de la β -galactosidase est à peine détectable que le traitement à la protéase L ait lieu ou non. A titre indicatif, l'effet de la protéase sur l'expression des deux gènes rapporteurs est illustré ci-après.

Tableau 1 : Rapport de l'expression des gènes en présence et en absence
30 de protéase L de FMDV.

| Construction | neo | LacZ |
|----------------|---------|---------|
| pREV CG-50. | - 51,85 | - 5,53 |
| pREV CB-54 | - 55,36 | + 40,24 |
| pREV CB-55 | - 34,65 | + 84,42 |
| pREV CG-58 | - 45,07 | + 57,51 |
| pEMCV-D260-837 | - 79,51 | + 33,93 |

EXEMPLE 2 : Vecteurs rétroviraux comprenant une séquence IRES
REV-A

On a construit une série de vecteurs rétroviraux utilisant les séquences REV-A à titre de sites IRES ou d'éléments augmentant l'encapsidation. La Figure 3 illustre les vecteurs de la série pREV HW possédant des LTRs de type MoMLV et les vecteurs témoins utilisés dans les expériences décrites ci-après.

Bien que ceux-ci ne soient pas représentés, on a également construit des vecteurs désignés pMC qui diffèrent des pREV HW uniquement par le fait que leurs LTRs sont d'origine SNV et des contrôles négatifs dans lesquels les séquences REV-A sont positionnées en orientation reverse (3' -> 5') par rapport aux LTRs. Pour toutes les étapes de biologie moléculaire, ces vecteurs sont introduits dans le plasmide pBR322.

1. Construction des vecteurs rétroviraux.

Le vecteur témoin pEMCV-CBTv (pBC100) est un vecteur dicistronique comprenant, outre les LTRs et la région d'encapsidation dérivés de MoMLV, le gène codant pour la phosphatase alcaline placentaire (plap) dont la traduction est coiffe-dépendante et le gène neo dont la traduction est dépendante du site IRES EMCV (Torrent et al., 1996, Human Gene Therapy 7, 603-611).

Les vecteurs pREV HW ont été obtenus de la façon suivante :

pREV HW-1 : le fragment REV-A s'étendant des nt 265 à 578 généré par PCR

et digéré par *NheI* est cloné entre les gènes *plap* et *neo* de pMLV-CB71 (Berlitz et Darlix, 1995, J. Virol. 69, 2214-2222).

pREV HW-2 : le fragment *EcoRI* de pVL CBT5 (Torrent et al., 1996, Human Gene Therapy 7, 603-611) portant le LTR 5' MoMLV et les séquences d'encapsidation de VL30 est introduit dans le vecteur pREV HW-1 linéarisé par *EcoRI*.

pREV HW-3 : le fragment *EcoRI* de pEMCV-CBTV contenant le LTR 5' et les séquences d'encapsidation de MoMLV est inséré dans le vecteur pREV HW-1 linéarisé par *EcoRI*.

10 pREV HW-4 : le fragment REV-A s'étendant des nt 452 à 578 généré par PCR et digéré par *NheI* est cloné entre les gènes *plap* et *neo* de pMLV-CB71.

pREV HW-5 : le fragment *EcoRI* de pVL CBT5 portant le LTR 5' MoMLV et les séquences d'encapsidation de VL30 est introduit dans le vecteur pREV HW-4 linéarisé par *EcoRI*.

15 pREV HW-6 : le fragment *EcoRI* de pEMCV-CBTV contenant le LTR 5' et les séquences d'encapsidation de MoMLV est inséré dans le vecteur pREV HW-4 linéarisé par *EcoRI*.

Les vecteurs de la série pMC sont obtenus selon le schéma de construction suivant : Les LTRs SNV sont générés par PCR à partir du plasmide
20 REV-A 2-20-6 (O'Rear et Temin, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1230-1234 ; Darlix et al., 1992, J. Virol. 66, 7245-7252). Le gène *neo* est isolé de pMLV-CB71 par digestion avec *Sall* et *BamHI* puis introduit entre les mêmes sites du vecteur pUC19 (Gibco BRL). Le LTR 5' du SNV (nt 1 à 861) est digéré par *HindIII* et *Sall*, et inséré dans pUC19-*neo* préalablement clivé par ces
25 mêmes enzymes. Le LTR 3' SNV (nt 7230-8300) digéré par *SmaI* et *EcoRI* est cloné dans le vecteur précédent pour donner pCG-61 contenant LTR 5' SNV-*neo*-LTR 3' SNV. En parallèle, on génère un vecteur désigné pCG-62 qui diffère du précédent par la délétion des séquences *env* (nt 7230-7691) obtenu par traitement *BglII-AvrII*, Klenow et religation. Le gène *plap* isolé du clone Cla-

12AP (DGoff) est introduit entre les sites *EcoRI* et *XbaI* d'un plasmide bluescript préalablement délété du site *Sall* (digestion *EcoRI-XbaI*) avant d'être réisolé sous la forme d'un fragment *KpnI-Sall* et cloné entre les mêmes sites de pCG-61 et pCG-62, pour donner pCG-63 et pCG-64 respectivement. Le gène
5 LacZ est obtenu par digestion partielle de pREV CB-95 par les enzymes *Sall* et *BamHI*. Son insertion entre les sites *Sall* et *BamHI* de pCG-61 et pCG-62 donne lieu à pCG-65 et pCG-66 respectivement. Enfin, le bloc LTR-Gene-LTR est isolé de chaque plasmide pCG-62, pCG-64 et pCG-66 par digestion *HindIII-EcoRI* pour être inséré dans le vecteur pBR322 clivé par ces mêmes enzymes.
10 On génère pMC1, pMC2 et pMC3.

*2. Génération de particules virales infectieuses et détermination du titre viral et de l'expression des gènes reporteurs *lap* et *neo*.*

La lignée de complémentation écotrope GP+E-86 (Markowitz et al.,
15 1988, J. Virol., 62, 1120-1124) et les cellules cibles NIH3T3 (cellules fibroblastiques de souris) disponibles à l'ATCC, sont cultivées à 37°C en présence de 5% de CO₂ dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL) complétement avec 10% de sérum de veau de nouveau-né. Les cellules helper GP+E-86 et les cellules cibles NIH3T3 sont mises en culture
20 la veille de la transfection et de l'infection. Les infections virales sont réalisées selon le protocole conventionnel décrit dans la littérature.

20 µg de vecteurs pREV HW-1 à 6 ainsi que de vecteur de référence pEMCV-CBTV sont transfectés en parallèle dans les cellules GP+E-86 (5x10⁵ cellules par boîte de 10cm) selon la méthode de Chen et Okyama (1987, Mol.
25 Cell. Biol., 7, 2745-2753 ; 1988, Bio/Techniques 6, 632-637). Différentes dilutions de surnageants des cultures GP+E-86 stables ou transitoires sont utilisées pour infecter les cellules cibles NIH3T3 ensemencées la veille de l'infection à raison de 2x10⁴ cellules par puits. Au préalable, les surnageants viraux ont été filtrés (sur filtres de 0,45 µm) et mis en présence de polybrène

à une concentration finale de 8 µg/ml. L'infection est poursuivie toute la nuit à 37°C et le jour suivant, les cellules sont lavées et cultivées dans du milieu frais. Après 48 h, les cellules sont placées en milieu sélectif (1 mg/ml de G418) ou colorées pour déterminer le nombre de cellules exprimant la phosphatase
5 alcaline plap. On procède tout d'abord à une fixation dans du tampon PBSx1 contenant 2% de formaldéhyde et 0,2% de glutaraldéhyde. Après deux rinçages dans du PBSx1 suivis d'une incubation de 30 min à 65°C dans du PBSx1, les cellules sont lavées à deux reprises dans du tampon AP (0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂ dans du PBSx1) et placées 5 h dans la solution
10 de coloration (0,1 mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP), 1 mg/ml d'un sel de térazolium de Nitroblue (NBT) et 1 mM de Levamisol dans du tampon AP). Ces expériences de coloration histochimique confirment l'expression de la phosphatase alcaline dans les cellules helper GP+E-86 et dans les cellules cibles NIH3T3.

15 Le titre des virus recombinants est déterminé après transfection des cellules écotopes GP+E-86. Après deux jours d'incubation, le surnageant viral est récolté et utilisé pour déterminer le titre viral (expression transitoire). Ensuite, les cellules transfectées sont sélectionnées au G418 pendant un mois. Après cette sélection, on détermine le titre viral sur le surnageant récolté
20 (expression stable). Celui-ci correspond au nombre de particules infectieuses par ml de surnageant. Par la méthode des dilutions limites, les cellules cibles NIH3T3 sont infectées avec des dilutions en série de surnageant viral et, après deux jours d'incubation, les cellules sont colorées histochimiquement et comptées. Les résultats suivants sont obtenus (Tableau 2):

25

30

| Vecteur | Expression transitoire (cfu/ml) | Expression stable (cfu/ml) |
|------------|------------------------------------|-------------------------------|
| pREV HW-1 | - | - |
| pREV HW-2 | $0,2 \times 10^4$ | $3,2 \times 10^6$ |
| pREV HW-3 | $1,6 \times 10^4$ | $1,4 \times 10^9$ |
| pREV HW-4 | - | - |
| pREV HW-5 | $1,3 \times 10^4$ | $6,5 \times 10^5$ |
| pREV HW-6 | $2,0 \times 10^4$ | $4,5 \times 10^8$ |
| pEMCV-CBTv | $1,1 \times 10^4$ | $2,1 \times 10^8$ |

10 Les vecteurs pREV HW-1 et pREV HW-4 dépourvus de région
 d'encapsidation conventionnelle sont incapables de produire des particules
 virales infectieuses après transfection dans la lignée helper MLV (GP+E-86).
 Cependant, on indique que le vecteur pMC1 peut être encapsidé dans des
 particules virales SNV après transfection de la lignée helper SNV D17-C3A2
 15 (par exemple ATCC CRL8468), indiquant que les séquences REV-A s'étendant
 des nt 265 à 578 peuvent être utilisées dans ce contexte à titre de région
 d'encapsidation. Les vecteurs rétroviraux comprenant à la fois une séquence
 REV-A (265-578 ou 452-578) et une région d'encapsidation conventionnelle
 produisent des particules virales à un titre élevé (pREV HW-2, 3, 5 et 6).
 20 Cependant l'association avec la région d'encapsidation de MLV s'avère
 particulièrement avantageuse puisqu'elle donne des titres viraux 2 (pREV
 HW-6) à 5 fois (pREV HW-3) plus élevés que le vecteur de référence
 pEMCV-CBTv combinant cette même région d'encapsidation et l'IRES EMCV.
 De plus, la comparaison des données obtenues avec les vecteurs identiques
 25 variant uniquement au niveau du segment REV-A mis en oeuvre (pREV HW-2
 et pREV HW-5 ou pREV HW-3 et pREV HW-6) laisse supposer que la
 séquence allant des nt 265 à 578 est capable de coopérer avec la région
 d'encapsidation et ainsi améliorer l'encapsidation des ARN viraux et en
 conséquence les titres viraux. Un élément interagissant d'une manière positive

avec l'encapsidation pourrait être présent entre les nt 452 et 265 dans le génome REV-A.

3. *Analyse des virus recombinants par microscopie électronique.*

5 La morphologie des virions recombinants pREV HW produits après transfection de la lignée GP+E-86 par les vecteurs correspondants est analysée par microscopie électronique. On utilise à titre de témoins les virus obtenus de pEMCV-CBTV dans les mêmes conditions et les rétrovirus sauvages obtenus après infection des cellules NIH3T3 avec la souche FMLV-29 (Friend murine
10 leukemia virus souche 29). Les résultats de microscopie indiquent que le contenu en ARN n'affecte pas la morphologie des virus recombinants.

4. *Effet de la rapamycine sur l'expression des cistrons plap et neo.*

 Les cellules GP+E-86 sont transfectées d'une manière stable par 20 µg
15 de vecteurs de la série pREV HW ou pEMCV-CBTV et cultivées en conditions sélectives (G418) pendant 15 jours. A 70 à 80 % de confluence, elles sont mises en présence de rapamycine à une concentration finale de 20 ng/ml. Cette dernière a un effet inhibiteur sur la traduction coiffe-dépendante variant de 15 à 40 % selon la lignée cellulaire (Beretta et al., 1996, EMBO J. 15, 658-664)
20 mais n'affecte pas la traduction cap-indépendante. Les extraits cellulaires sont préparés classiquement après 20 h d'incubation. Brièvement, les cellules sont lavées deux fois dans du PBSx1, placées dans 1 ml de TEN (40 mM Tris-HCl pH7,5, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl) pour une boîte de 10 cm puis récupérées par grattage et centrifugées à faible vitesse. Le culot est repris dans 100 µl de
25 Tris-HCl 0,25 M, pH8 et soumis à une lyse cellulaire par 3 cycles de congélation-décongélation. Après centrifugation 10 min à 14000 g, le surnageant est récupéré et peut être conservé à -70°C en attendant de procéder aux tests enzymatiques. La concentration finale en protéine est déterminée par le test Micro BCA (Pierce). L'activité enzymatique plap des extraits cellulaires est

évaluée spectrophotométriquement (kit alcaline phosphatase, BIORAD). Les unités plap sont déterminées par rapport à un standard constitué par la phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim). Les activités neo sont mesurées par le transfert de phosphate marqué au $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ sur la neomycine (Ramesh et Osborne, 1991, Anal. Biochem. 193, 316-318). Les résultats de l'expression des gènes plap et neo mesurés en absence et en présence de rapamycine sont illustrés à la Figure 4 et présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : effet de la rapamycine sur l'expression des cistrons plap et neo exprimé en % par rapport aux cellules non traitées.

| Lignée cellulaire | phosphatase alcaline | Neomycine phosphotransférase |
|-------------------|-------------------------|---------------------------------|
| GP+E-86 | - | - |
| pREV HW-1 | -40,9 | +21,5 |
| pREV HW-2 | +21,3 | +26,7 |
| pREV HW-3 | +34,8 | -6,5 |
| pREV HW-4 | -94,6 | +3,0 |
| pREV HW-5 | +66,7 | +46,9 |
| pREV HW-6 | +46,1 | +49,6 |
| pEMCV-CBTv | -2,6 | +20,5 |

Dans les vecteurs pREV HW-1 et pREV HW-4, la présence de rapamycine réduit la traduction cap-dépendante et augmente celle dépendante de l'IRES. Cette stimulation peut s'expliquer par une moindre compétition pour la machinerie traductionnelle en présence de rapamycine. Lorsque deux éléments IRES sont présents, l'addition de rapamycine s'accompagne d'une augmentation de l'expression des deux gènes. Cependant, les données quantitatives d'expression indiquent que l'activité relative des IRES est différente, ce qui suggère une compétition entre eux pour les ribosomes.

En résumé, l'ensemble des données montrent la présence d'un site IRES

- 30 -

efficace dans le leader 5' des ARN du virus REV-A et, probablement d'un élément interagissant de manière positive avec l'encapsidation. L'élément IRES minimum est contenu au sein d'une séquence de 129 nt (positions 452 à 578).

- 31 -

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: INSERM
 (B) RUE: 101 rue de Tolbiac
 (C) VILLE: Paris cedex 13
 (E) PAYS: France
 (F) CODE POSTAL: 75654
 (G) TELEPHONE: 01 44 23 60 00
 (H) TELECOPIE: 01 45 85 68 56

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Nouveau site interne d'entree des ribosomes
 et vecteur le contenant.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Tape
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 940 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ARN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Reticuloendotheliosis virus
 (B) SOUCHE: type A (REV-A)
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: leader 5' de l'ARN genomique REV-A

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

| | |
|---|-----|
| AAUGUGGGAG GGAGCUCCGG GGGGAAUAGC GCUGGCUCGC UAACUGCCAU AUUAGCUUCU | 60 |
| GUAUAUCAGC UUGCUUGCCU UAGCCGCCAU UGUACUUGAU AUAUUUCGCU GAUAUCAUUU | 120 |
| CUCGGAAUCG GCAUCAUUUC UCGGAAUCGG CAUCAAGAGC AGGCUCAUAG ACCAUA AAAAG | 180 |
| GAAAUUGUUC UUGGAGGCGA GCAUCAGACC ACUUGCGCCA UCCAAUCACG AGCAAACACG | 240 |
| AGAUCGAACU AUCAUACUGA GCCAAUGGUU GUAAAGGGCA GAUGCUAUCC UCCAAUGAGG | 300 |
| GAUUAUGUCA UGCAACAUCU UGUCCUGUAA GCGGCUAUU AAGCCAGGUG CAUCUCUUGC | 360 |

- 32 -

```

UCGGGGUGCG CGUCCUACAC AUUGUUGUGA CGCGCGGCC AGAUUCGAU CUGUAAUAAA 420
AGUUUUUUUC UUCUAUAUCC UCAGAUUGGC AGUGAGAGGA GAUUUUGUUC GUGGUGUAGG 480
CUGGCCUACU GGGUGGGGUA GGGGUCCGGA CUGAAUCCGU AGUAUUUCGA UACAACAUUU 540
GGGGGCUCGU CCGGGAUUC UCCCCAUCGG CAGAAGUGCC UACUGUUUCU UCGAACUCCG 600
GCGCCGGUAA GUAAGUACUU GAUUUUGGUA CCUCGCGAGG GUUUGGGAGG AUCGGAGUGG 660
CGGGACGUG CCGGGAAGCU CCACCUCGCG UCAGCAGGGG ACGCCCUGAU CUGAGCUCUG 720
UGGUUAUCUGA UUGUUGUUGG ACCGUCUCCA AGACGGUGAU AAUAUAAGUC GUGGUUUGUG 780
UGUUUGUUUG UUACCUUGUG UUUGUUCGUC ACUUGUCGAC AGCGCCUGC GAAUUGGUGU 840
GCCACACCG CGCGGCUUGC GAAUAUACU UUGGAGAGUC UUUUGCCUCC AGUGUCUUC 900
GUUUGUACUC GUCCUCCUCU CCCUCUCCGG CCGGGAUGGG 940

```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 578 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ARN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Reticuloendotheliosis virus
- (B) SOUCHE: type A (REV-A)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

```

GGGUGCGCCG UCCUACACAU UGUUGUGACG CGCGGCCAG AUUCGAUUCU GUAAUAAAAG 60
UUUUUUUCU CUAUAUCCUC AGAUUGGCAG UGAGAGGAGA UUUUGUUCGU GGUGUAGGCU 120
GGCCUACUGG GUGGGGUAGG GUCCGGACU GAAUCCGUAG UAUUUCGAUA CAACAUUUGG 180
GGGCUCGUCC GGAUUCUCC CCAUCGGCA GAAGUGCCUA CUGUUUCUUC GAACUCCGGC 240
GCCGUAAGU AAGUACUUGA UUUUGGUACC UCGCGAGGGU UUGGGAGGAU CGGAGUGGCG 300
GGACGCUGCC GGAAGCUCC ACCUCCGUC AGCAGGGGAC GCCUGAUCU GAGCUCUGUG 360
GUAUCUGAUU GUUGUUGGAC CGUCUCCAAG ACGUGAUAA UAUAAGUCGU GGUUUGUGUG 420
UUUGUUUGUU ACCUUGUGUU UGUUCGACAG UGUCGACAG CGCCUGCGA AUUGGUGUGC 480
CCACACCGCG CGGCUUGCGA AUAUACUUU GGAGAGUCUU UUGCCUCCAG UGUCUCCGU 540
UUGUACUCGU CCUCCUCCU CUCUCCGGCC GGAUGGG 578

```

Revendications

1. Utilisation d'une séquence nucléotidique dérivée de tout ou partie de l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un rétrovirus de type C à l'exception des virus de la leucémie murine de Friend (FMLV) et de Moloney (MoMLV), à titre de site interne d'entrée des ribosomes (IRES) dans un vecteur et/ou pour permettre ou améliorer l'encapsidation d'un vecteur rétroviral.
2. Utilisation selon la revendication 1, selon laquelle le rétrovirus de type C est sélectionné parmi les virus REV, MSV, MHV, MEV, FMOV, AMLV, MEELV, SFFV, RASV, FLV, FSV, EFLV, SSV, GALV et BAEV.
3. Utilisation selon la revendication 2, selon laquelle ladite séquence nucléotidique dérive de tout ou partie de l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un virus de la réticuloendotélïose.
4. Utilisation selon la revendication 3, selon laquelle ladite séquence nucléotidique dérive de tout ou partie de l'extrémité 5' de l'ARN génomique d'un virus de la réticuloendotélïose aviaire et, notamment de type A.
5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, selon laquelle ladite séquence nucléotidique est substantiellement homologue ou identique à tout ou partie de la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 1.
6. Utilisation selon la revendication 5, selon laquelle ladite séquence nucléotidique est substantiellement homologue ou identique à la séquence

présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 :

- (i) commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 578,
 - (ii) commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578,
ou
 - 5 (iii) commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578.
7. Utilisation selon la revendication 6, selon laquelle ladite séquence nucléotidique est identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 :
- 10 (i) commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 578,
 - (ii) commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578,
ou
 - (iii) commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578.
- 15 8. Vecteur pour l'expression d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt comprenant ladite séquence nucléotidique en usage selon l'une des revendications 1 à 7.
9. Vecteur selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un
- 20 vecteur plasmidique ou d'un vecteur viral dérivé d'un virus sélectionné parmi le groupe des poxvirus, adénovirus, baculovirus, virus de l'herpès, virus associé à un adénovirus et rétrovirus.
10. Vecteur selon la revendication 8 ou 9, dérivant d'un rétrovirus et
- 25 comprenant au moins les éléments suivants associés d'une manière fonctionnelle : un LTR 5' et un LTR 3' rétroviraux, un ou plusieurs gène(s) d'intérêt, et ladite séquence nucléotidique telle que définie dans l'une des revendications 1 à 7 pour permettre ou améliorer l'encapsidation dudit vecteur dans une particule virale et/ou à titre de site IRES pour
- 30 permettre ou améliorer l'expression d'un gène d'intérêt positionné en aval

de ladite séquence nucléotidique.

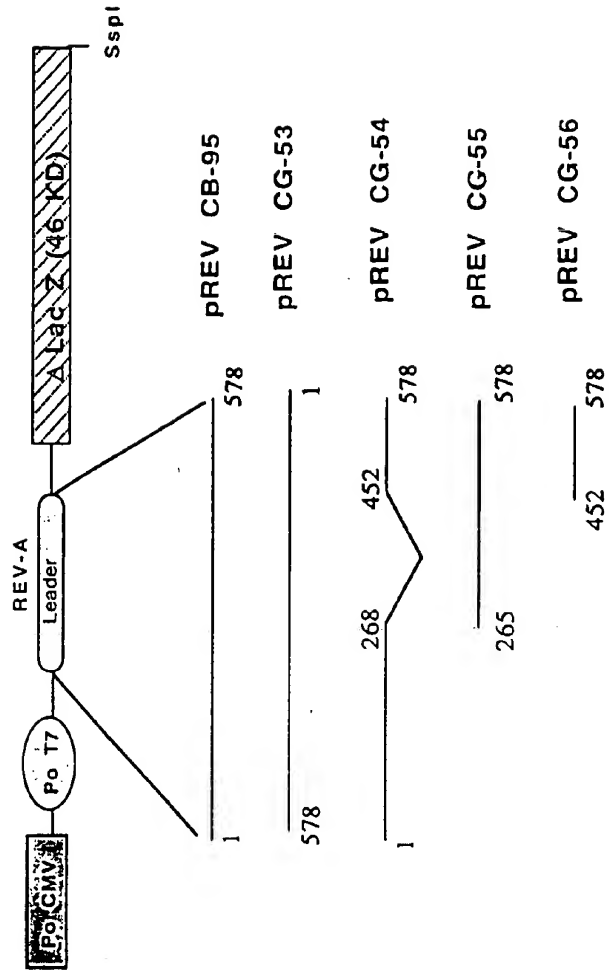
11. Vecteur rétroviral selon la revendication 10, dans lequel ladite séquence
nucléotidique est à titre de site IRES et comprenant en outre une région
5 d'encapsidation hétérologue à ladite séquence nucléotidique.
12. Vecteur rétroviral selon la revendication 10 ou 11, comprenant au moins :
- (a) un LTR 5' rétroviral,
 - (b) une région d'encapsidation,
 - 10 (c) de manière optionnelle, un premier gène d'intérêt suivi d'une
région promotrice interne une origine différente de celle dudit
LTR 5' rétroviral,
 - (d) un second gène d'intérêt,
 - (e) un site IRES,,
 - 15 (f) un troisième gène d'intérêt, et
 - (g) un LTR 3' rétroviral,
- l'un au moins de la région d'encapsidation et du site IRES étant constitué
par ladite séquence nucléotidique en usage selon l'une des revendications
1 à 7.
- 20
13. Vecteur rétroviral selon la revendication 12, dans lequel la région
promotrice interne, le second gène d'intérêt, le site IRES et le troisième
gène d'intérêt sont dans une orientation inverse par rapport aux LTRs 5'
et 3' rétroviraux.
- 25
14. Vecteur rétroviral selon la revendication 12 ou 13, dans lequel la région
d'encapsidation dérive d'un rétrovirus murin, notamment d'un MoMLV,
ou d'un rétrotransposon de type VL30 et le site IRES comprend une
séquence nucléotidique telle que définie à la revendication 6.
- 30

15. Vecteur rétroviral selon la revendication 14, dans lequel la région d'encapsidation dérive d'un MoMLV et le site IRES comprend une séquence nucléotidique identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578 ou commençant au nucléotide 452 et se terminant au nucléotide 578.
16. Vecteur rétroviral selon la revendication 10, comprenant un LTR 5' rétroviral dérivé d'un virus REV, notamment SNV, un LTR 3' rétroviral d'une origine quelconque, un ou plusieurs gène(s) d'intérêt, et une séquence nucléotidique substantiellement homologue ou identique à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2 commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 578, ou commençant au nucléotide 265 et se terminant au nucléotide 578, à titre de région d'encapsidation.
17. Un vecteur selon l'une des revendications 8 à 16, comprenant un gène d'intérêt codant pour un produit d'expression sélectionné parmi le facteur VIII, le facteur IX, la protéine CFTR, la dystrophine, l'insuline, l'interféron alpha, bêta, gamma, une interleukine (IL) notamment l'IL-2 et un marqueur de sélection.
18. Une particule virale générée à partir d'un vecteur viral selon l'une des revendications 8 à 17.
19. Une cellule comprenant un vecteur selon l'une des revendications 8 à 17 ou infectée par une particule virale selon la revendication 18.
20. Utilisation d'un vecteur selon l'une des revendications 8 à 17, d'une particule virale selon la revendication 18 ou d'une cellule selon la

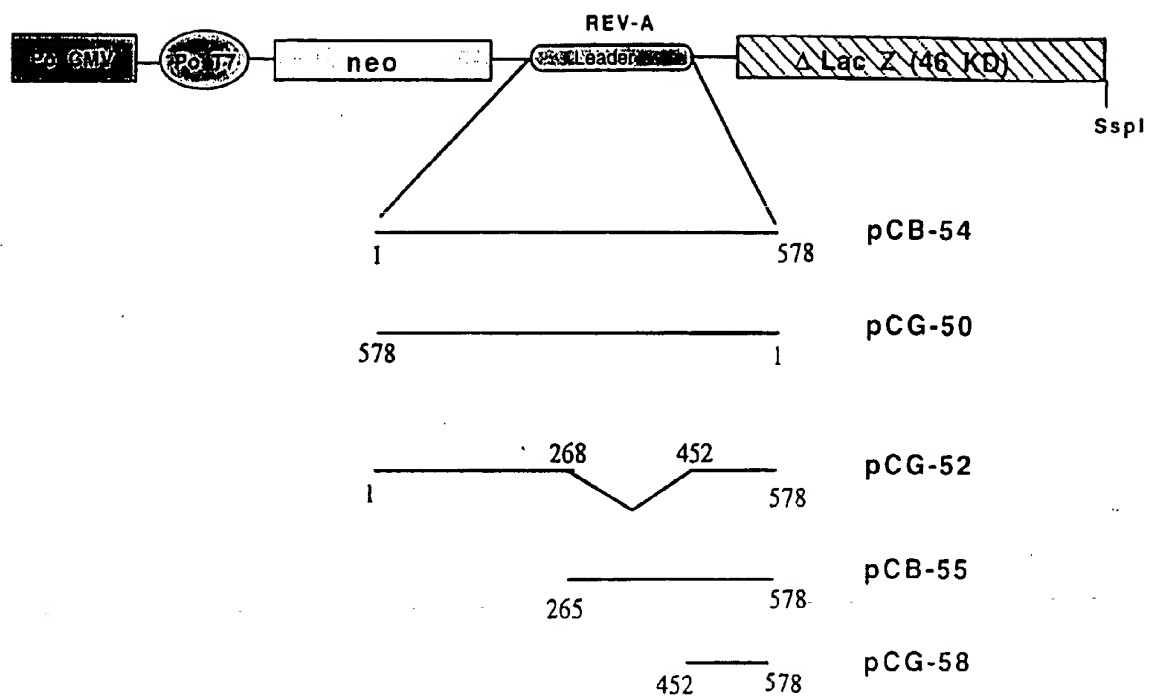
revendication 19 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention d'une maladie traitable par thérapie génique.

- 5 21. Utilisation d'un vecteur selon l'une des revendications 8 à 17, d'une particule virale selon la revendication 18 ou d'une cellule selon la revendication 19 pour la préparation d'un ou plusieurs polypeptides d'intérêt par voie recombinante ou pour la production d'un animal transgénique.
- 10 22. Une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique, un vecteur selon l'une des revendications 8 à 17, une particule virale selon la revendication 18, une cellule selon la revendication 19 ou un polypeptide d'intérêt obtenu selon l'utilisation
- 15 selon la revendication 21, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
23. Une composition pharmaceutique selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu, et de préférence entre 10^6
- 20 et 10^{11} pfu particules virales selon la revendication 18.

- Figure 1 -

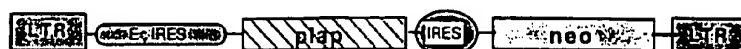


- Figure 2 -

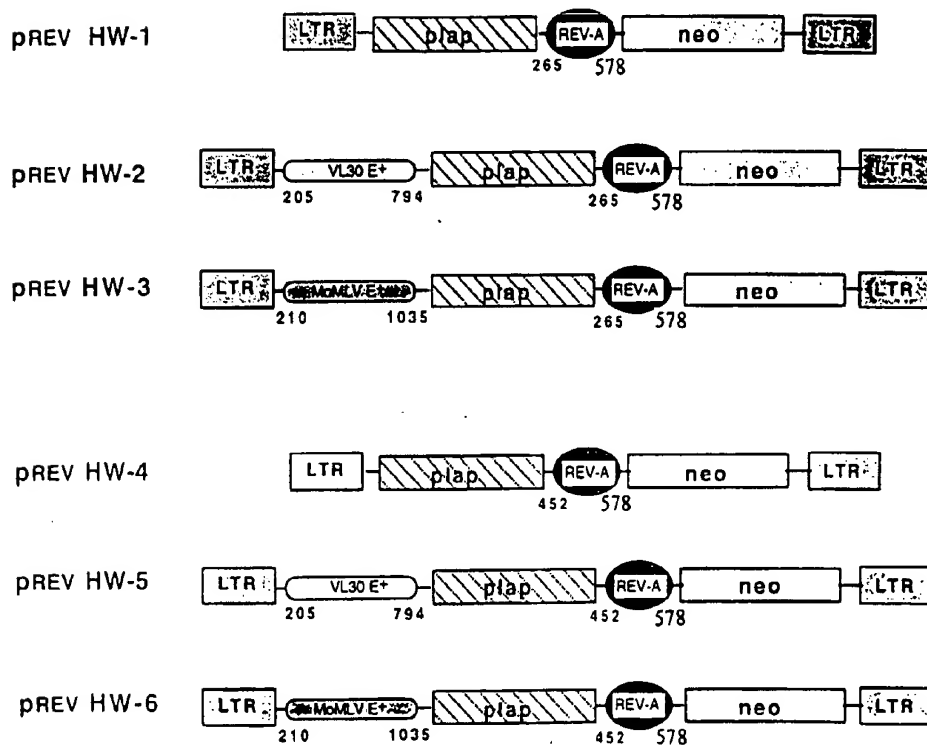


- Figure 3 -

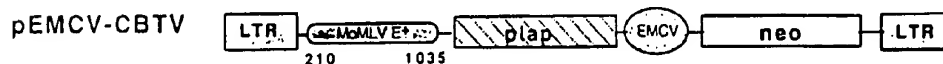
A) Structure générale des vecteurs rétroviraux



B) Nouveaux vecteurs rétroviraux dicistroniques.

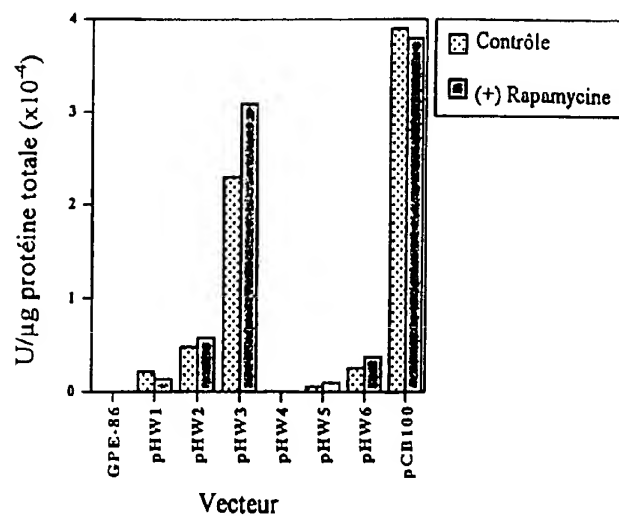


C) Vecteur de Contrôle

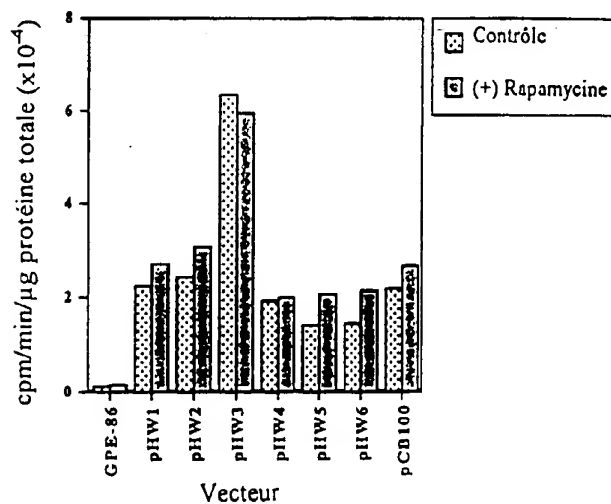


-Figure 4-

A) Effet de la rapamycine sur l'activité phosphatase alcaline



B) Effet de la rapamycine sur l'activité neomycine phosphotransférase



2762615

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 544307
FR 9705203

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | Revendications concernées de la demande examinée |
|--|--|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | |
| X | WO 96 01324 A (INSERM) | 1,2, 8-11, 17-22 |
| A | * le document en entier * | 3-7, 12-15 |
| X | WO 94 05786 A (BEIERSDORF AG) --- * abrégé * * page 5, ligne 9 - page 6, ligne 7 * * page 9, ligne 29 - page 15, ligne 13 * * revendications 1-18 * | 1,2,8, 17-22 |
| X | WO 94 05785 A (BEIERSDORF AG) --- * abrégé * * page 9, ligne 29 - page 22, ligne 20 * | 1,2,8, 17-22 |
| A,D | WO 93 03143 A (ANDERSON W. ET AL.) * abrégé * * page 1 - page 3 * * page 5 - page 9 * * revendications * | 1-23 |
| A | US 5 112 767 A (ROY-BURMAN PRADIP ET AL.) ----- ----- | 13 |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur |
| 19 janvier 1998 | | Panzica, G |
| <p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p> | | |

2

EPO FORM 1503 03.82 (PpAC.12)